

PCT/KR 10/500696

RO/KR 03/00231
Rec'd PCT/TO 11 02 2003
01 JUL 2004

REC'D 24 FEB 2003

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0005969
Application Number PATENT-2002-0005969

출원년월일 : 2002년 02월 01일
Date of Application FEB 01, 2002

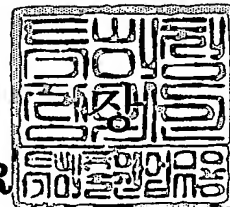
출원인 : 주식회사 이뮤네드
Applicant(s) IMMUNEMED INC.



2003 년 02 월 06 일

특허청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

| | |
|------------|---|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2002.02.01 |
| 【발명의 명칭】 | 신규한 항바이러스 활성을 지닌 단백질 V S F 및 이를 분 비하는 하이브리도마 |
| 【발명의 영문명칭】 | A Novel Virus Suppressing Protein VSF And Hybridoma Producing The Same |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 주식회사 이문메드 |
| 【출원인코드】 | 1-2001-052189-9 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 손민 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000420-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2001-074138-3 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이세진 |
| 【대리인코드】 | 9-2000-000320-8 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2001-074140-3 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 김성남 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000150-9 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2001-074139-1 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김윤원 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,YOON WON |
| 【주민등록번호】 | 551021-1066824 |
| 【우편번호】 | 200-170 |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 퇴계동 그린타운 아파트 103동 302호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김영진 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,YOUNG JIN |

| | |
|------------|--|
| 【주민등록번호】 | 731216-2261719 |
| 【우편번호】 | 200-180 |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 석사동 퇴계 주공1단지 아파트 402동 1004호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 최요한 |
| 【성명의 영문표기】 | CHOI, YO HAN |
| 【주민등록번호】 | 700624-1041611 |
| 【우편번호】 | 790-390 |
| 【주소】 | 경상북도 포항시 남구 지곡동 756 남자 기숙사 10동 402호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 안지인 |
| 【성명의 영문표기】 | AHN, JEE YIN |
| 【주민등록번호】 | 720815-2814625 |
| 【우편번호】 | 200-180 |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 석사동 삼익 아파트 102동 1201호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 우수동 |
| 【성명의 영문표기】 | WOO, SOO DONG |
| 【주민등록번호】 | 681128-1110411 |
| 【우편번호】 | 441-450 |
| 【주소】 | 경기도 수원시 권선구 호매실동 453-6 쌍용 아파트 102동 1502호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 신송우 |
| 【성명의 영문표기】 | SHIN, SONG WOO |
| 【주민등록번호】 | 630511-1090810 |
| 【우편번호】 | 200-160 |
| 【주소】 | 강원도 춘천시 후평동 현대1차 아파트 101동 304호 |
| 【국적】 | KR |

【발명자】

【성명의 국문표기】

조민기

【성명의 영문표기】

CHO, MIN KEE

【주민등록번호】

380319-1042215

【우편번호】

200-163

【주소】

강원도 춘천시 후평3동 현대3차 아파트 301동 1101호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

변용환

【성명의 영문표기】

BYUN, YOUNG HWAN

【주민등록번호】

550505-1822017

【우편번호】

200-163

【주소】

강원도 춘천시 후평3동 주공 아파트 328동 402호

【국적】

KR

【미생물기탁】

【기탁기관명】

한국세포주은행 (KCLRF)

【수탁번호】

KCLRF-BP-00052

【수탁일자】

2001. 12. 21

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인

민 (인) 대리인

이세진 (인) 대리인

김성남 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

23 면 23,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

0 항 0 원

【합계】

52,000 원

【감면사유】

중소기업

【감면후 수수료】

26,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 신규한 항바이러스 활성을 지닌 단백질 VSF 및 이를 분비하는 하이브리도마를 제공한다. 또한 본 발명은 상기 단백질을 포함하는 바이러스에 의한 사람 및 동물의 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 단백질 VSF는 여러 종류의 바이러스에 대한 강력한 항바이러스 활성이 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

항바이러스, 하이브리도마, 단백질 VSF, 뇌심근염 바이러스

【명세서】

【발명의 명칭】

신규한 항바이러스 활성을 지닌 단백질 V S F 및 이를 분비하는 하이브리도마 {A Novel Virus Suppressing Protein VSF And Hybridoma Producing The Same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따라 정제된 단백질 VSF의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다(레인 1: 정제전의 VSF, 레인 2: 단백질-A 아가로스 컬럼으로 정제한 VSF, 레인 3: 블루 세파로스 컬럼으로 정제한 VSF).

도 2는 본 발명에 따른 단백질 VSF를 센트리콘을 사용하여 크기별로 분획한 결과이다 (A: 분자량 50kDa 내지 100kDa, B: 분자량 100kDa 내지 500kDa, C: 분자량 500kDa 이상).

도 3은 본 발명에 따른 하이브리도마를 마우스 복강 내에 주입하여 생성된 복수액의 EMC 바이러스 및 Mengo 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 MTS 점정법으로 분석한 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 하이브리도마 배양액의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 하이브리도마를 마우스 복강 내에 주입하여 생성된 복수액의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 하이브리도마를 마우스 복강 내에 주입하여 생성된 복수액의 HIV-1 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명에 따른 하이브리도마 배양액의 EMC 바이러스에 의한 당뇨유발 억제효능을 EMC 바이러스에 감염된 마우스의 체중비교로써 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <8> 본 발명은 신규한 항바이러스 활성물질, 구체적으로 항바이러스 활성을 지닌 단백질 및 이를 분비하는 하이브리도마에 관한 것이다. 보다 자세하게는, 본 발명은 뇌심근염 바이러스의 변종 바이러스에 감염된 면역세포를 골수종세포와 융합시켜 제조한 하이브리도마로부터 지속적으로 분비되며 다양한 바이러스에 대한 억제활성을 지닌 단백질 및 이를 분비하는 하이브리도마에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단백질을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- <9> 현재 개발된 항바이러스제는 크게 화학물질과 생체유래 물질로 구분할 수 있다. 화학물질의 경우 대부분 특정 바이러스 질환에만 작용하도록 개발되었으며 여러 가지 부작용이 나타나고, 내성 바이러스가 쉽게 출현하는 등 많은 단점이 있다.
- <10> 생체유래 물질로는 인터페론(IFN)과 같은 사이토카인(Cytokine)이 잘 알려져 있다. 이러한 사이토카인은 화학약물과 달리 심각한 부작용은 나타나지 않지만 작용범위가 극히 제한적이고, 체내에서의 실제적인 효과가 미약한 단점이 있다.

- <11> 한편, HIV에 감염되었으나 AIDS 증세를 나타내지 않는 감염자들이 나타남에 따라 이들의 면역세포는 HIV를 억제하는 특별한 기전이 있을 것이라 추론되었다. 최근에, 바이러스에 감염된 CD8+ 세포가 새로운 수용성 물질을 분비하여 바이러스 억제작용을 나타낸다는 사실이 과학자들에 의해 확인되고 있다.
- <12> AIDS 증세가 나타나지 않은 HIV 감염자의 CD8+ 세포를 인공적으로 배양한 후, 그 배양 상층액을 HIV 감염세포에 처리하였더니 HIV의 증식이 억제되는 것이 관찰되었고, CD8+ 세포가 수용성 항바이러스 물질을 분비하는 것을 발견하게 되었다(Walker CM et al., Science, 234, 1563-1566(1986), Walker CM et al., Immunology, 66, 628-630 (1989)). 이 수용성 항바이러스 물질은 단지 HIV에 감염된 사람에서만 확인되는 것이 아니라 SIV에 감염된 원숭이, FIV에 감염된 고양이 등에서도 확인되었다. 또한 헤르페스바이러스에 감염된 CD8+ 세포가 분비하는 수용성 항바이러스 물질이 HIV의 증식을 억제한다는 사실도 확인되었는데, 이는 특정 바이러스에 감염된 면역세포가 분비하는 항바이러스 물질이 다른 바이러스에 대해서도 효과를 나타낸다는 매우 흥미 있는 결과였다. 상기 항바이러스 물질은 CAF(CD8+ cell Antiviral Factor)로 명명되었으며, 이의 성분규명에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 현재까지는 이 물질이 기존에 알려진 인터페론과는 다른 종류의 사이토카인(cytokine)이라는 사실만 밝혀졌다. CAF는 바이러스에 직접 작용하기 보다는 세포에 영향을 끼쳐 세포를 항바이러스 상태로 만드는 것으로 추론되고 있다. 따라서, 기존의 항바이러스 치료제와는 달리 예상치 못했던 부작용(side effect)이나 내성 바이러스의 출현이 거의 없을 것으로 예상된다.

- <13> 미국특허 제5707814호에는 HIV, SIV 및 레트로바이러스 감염을 억제하는 활성이 있으며, CD8+ 세포 배양액으로부터 분리된 CAF가 개시된 바 있다. 국제특허 제 01/07472A1호에는 산란계를 면역화하여 획득한 알로부터 분리한 CAF가 개시된 바 있다.
- <14> 그러나, 상기 공지기술의 경우에는 항바이러스 물질 CAF를 분비하는 CD8+ 세포를 실험실에서 인위적으로 생산하는 것이 매우 어려우며 상기 세포가 지속적으로 생존하지 못하기 때문에 항바이러스 물질의 분비가 일시적이고 분비량이 소량인 단점이 있다. 그러므로 동물을 모델로 사용하는 실험이 수행될 수 없었고 또한, CAF를 분비하는 세포의 배양액을 10배 이상 희석하면 시험관내(in vitro)에서도 그 효과를 관찰하기 어려운 단점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <15> 이에 본 발명자들은 항바이러스 물질에 대해 연구하던 중 뇌심근염 바이러스의 변종을 동물에 주입하여 자극시킨 면역세포를 추출하고 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 제작함으로써, 항바이러스 물질을 지속적으로 분비하는 세포주를 제조하였으며, 이로부터 분비되는 항바이러스 물질의 특성을 규명하였다.
- <16> 따라서, 본 발명은 항바이러스 활성을 지닌 신규한 단백질 VSF를 제공한다.
- <17> 본 발명에 따른 단백질 VSF는 (a) 뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMV-DV에 의해 자극을 받은 면역세포에서 그 생산이 증가되며, (b) 항바이러스 활성이 있고, (c) 프로테아제 K에 의해 불활성화되며, (d) 항바이러스성 사이토카인인 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15,

IL-16, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ , MCP-1, MCP-3, IP-10, 및 림포타틴

(lymphotactin)이 아니며, (e) 몇 개의 단백질 서브 유닛들이 공유결합 또는 비공유결합을 이루고 있는 형태로 분자량이 약 100kDa 이상임을 특징으로 한다.

<18> 또한, 본 발명에 따른 단백질 VSF는 뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMC-DV에 의해 자극을 받은 면역세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, 생성된 하이브리도마의 배양액으로부터 분리됨을 특징으로 한다.

<19> 또한, 본 발명에 따른 단백질 VSF는 뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMC-DV에 의해 자극을 받은 면역세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, 생성된 하이브리도마를 동물에 주입하고, 주입 후 일정기간이 지난 다음 회수한 동물의 복수로부터 분리됨을 특징으로 한다.

<20> 또한, 본 발명은 상기 단백질 VSF를 생산하는 하이브리도마 및 복수를 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 단백질 VSF를 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 함유함을 특징으로 하는, 바이러스에 의한 동물의 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물 및 이를 이용한 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <22> 본 발명은 VSF라 명명된 신규한 항바이러스 활성을 지닌 단백질을 제공한다. 본 발명의 단백질 VSF는 뇌심근염 바이러스(encephalo myocarditis virus; EMCV)의 변종바이러스인 EMC-DV에 의해 자극을 받은 세포에서 발현이 증가된다. 뇌심근염 바이러스는 피코르나 비리데(Picornaviridae)에 속하는 바이러스이다 (김윤원, 대한미생물학회지, 30, 671-681 (1995); Craighead JE, Progress in Medical Virology, 19, 161-214 (1975)). 뇌심근염 바이러스에는 M 변종 바이러스, D 변종 바이러스, B 변종 바이러스 및 DV 변종 바이러스등을 포함하여 다양한 변종 바이러스들이 알려져 있다.
- <23> EMCV의 M변종 바이러스(EMC-M 바이러스)는 마우스에서 일정하지 않은 발병빈도로 당뇨병을 일으키며 EMCV의 D변종 바이러스는 90%이상의 비율로 당뇨병을 일으킨다 (Craighead JE and McLane MF, Science, 162, 913-914 (1968)). EMCV의 B변종 바이러스는 마우스에서 당뇨병을 전혀 일으키지 않는 것으로 알려져 있으며 이들은 플라크 정제 (plaque purification)에 의해 분리된 바 있다(Yoon JW et al., J. Gen. Virol, 69, 1085-1090 (1988)). 상기 EMC-D 바이러스와 EMC-B 바이러스는 생화학적이거나 면역학적으로 거의 구분되지 않으나, EMC-D 바이러스는 IFN(인터페론) 생산을 거의 유도하지 못하고 EMC-B 바이러스는 다량의 IFN을 유도하는 특성이 있다(Yoon JW et al., J. Infect Dis, 147, 155-159 (1983)). 따라서, 당뇨병 발병의 유무는 IFN 생산의 유도 여부에 따른 것으로 간주될 수 있다. 한편, EMC-DV 변종 바이러스는 IFN을 거의 유도하지 않으면서도 당뇨병을 일으키지 않는 것으로 본 발명자의 연구를 통하여 발견되었다(Kim YW et al. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 30, 671-681 (1995)).

- <24> EMC-D 바이러스와 EMC-DV 바이러스는 모두 체장의 베타 세포에 부착이 가능하며, 생체 외(*in vitro*) 세포 배양시 복제 및 증식이 일어나 베타 세포를 파괴하는 특성이 있다. 그러나, 생체 내(*in vivo*) 감염시에는 EMC-D 바이러스만이 베타 세포의 파괴 및 당뇨병 유발이 가능하며, EMC-DV 바이러스는 감염 48시간 이후에 복제가 정지되고 바이러스 단백질이 점차 사라지는 특성이 있다. EMC-DV 바이러스는 감염 후 복제가 일어나지만 곧 소멸되며 면역세포 침투(*infiltration*)를 유도하지 않기 때문에 감염된 세포가 사멸되지 않는 특징이 있다.
- <25> 본 발명의 VSF 단백질은 EMC-DV 바이러스에 의해 자극을 받은 세포에서 그 생산이 증가되는 단백질이다. "세포"는 동물 세포를 의미하며, 바람직하게는 바이러스의 감염방어, 다른 개체 세포의 거절, 변이세포 노폐조직의 제거와 같은 역할을 하는 면역세포를 말한다. 더욱 바람직하게는, 비장에 존재하는 면역세포를 말한다. 예를 들어, 면역세포로는 마크로파지(*macro phage*), 과립구, T세포, B세포, NK세포 및 LAK세포 등이 있다.
- <26> 상기 "동물"은 소, 양, 돼지, 말, 개, 닭, 오리 및 칠면조를 포함하는 가축, 마우스, 랫트, 햄스터 및 사람을 포함하는 포유동물, 어류, 양서류, 파충류 및 조류를 말한다.
- <27> "항바이러스 활성"은 병원성 바이러스의 증식 또는 복제를 억제하는 활성을 말한다. "병원성 바이러스"는 동물에 질병을 일으키는 바이러스를 말하며, 병원성 바이러스의 예로는 오소믹소비리데(*Orthomyxoviridae*) 속 바이러스, 피코르나비리데(*Picornaviridae*) 속 바이러스, 레트로비리데(*Retroviridae*) 속 바이러스 및 헤르페스(*Herpes*) 속 바이러스를 들 수 있다. 병원성 바이러스는 바람직하게는, EMC 바이러스, Mengo 바이러스, 인플루엔자 바이러스, HIV 및 인간 싸이토메갈로바이러스(*Human Cytomegalovirus, HCMV*)이다. 인플루엔자 바이러스는 오소믹소비리데 (*Orthomyxoviridae*)에 속하는 바이러스로서

피코르나비리데(Picornaviridae)에 속하는 EMC 바이러스와는 유전체 구조와 생활사가 전혀 다르다. 그러나, 본 발명에 따른 단백질 VSF는 피코르나비리데에 속하는 Mengo 바이러스 뿐 만 아니라 다른 종류의 바이러스에서도 광범위하게 항바이러스 효과를 나타내었다. 본 발명에 따른 단백질 VSF는 레트로비리데(Retro viridae)에 속하는 HIV-1의 증식도 효과적으로 저해함이 관찰되었다(실시예 10 내지 실시예 12).

<28> 본 발명에 따른 항바이러스 활성물질은 다음과 같은 특성을 지닌다.

<29> 본 발명의 항바이러스 활성은 프로테아제 K에 의해 불활성화 되는 특성이 있다. 이는 본 발명의 항바이러스 활성이 단백질이라는 것을 강력히 뒷받침하는 증거이다. 본 발명자들은 VSF에 프로테아제 K를 1mg/ml 내지 4mg/ml를 처리하고 37℃에서 1시간 반응시켰을 때 VSF의 항바이러스 활성을 잃게되는 반면 트립신에는 저항성을 나타냄을 확인하였다(실시예 3).

<30> 본 발명에 따른 단백질 VSF는 프로테아제에 의해 불활성화되고 사이토카인과 유사한 생물활성을 나타내지만 종래에 알려진 항바이러스성 사이토카인과는 다른 생물학적 활성 특징을 보이는 단백질이다. 본 발명의 VSF는 종래에 알려진 항바이러스성 사이토카인인 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ , MCP-1, MCP-3, IP-10, 및 림포타틴(lymphotactin)과 같은 사이토카인과는 다른 종류의 단백질이다.

<31> 본 발명자들은 단백질 VSF를 분리하는 하이브리도마에 대하여 특정 사이토카인의 발현 여부를 조사하고자 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 실시하였고 그 결과, 본 발명의 하이브리도마는 위에 열거한 특정 사이토카인을 발현하지 않음을 실험으로 확인하였다 (실시예 4).

<32> 또한, 본 발명의 VSF는 몇 개의 단백질 서브 유니트들이 공유결합 내지 비공유결합을 이루고 있으며 분자량이 약 100kDa 이상, 혹은 약 500kDa 이상의 거대분자를 형성하고 있다. 본 발명자들은 센트리콘(Centricon™)을 사용하여 VSF의 분자량을 측정한 결과, 자연상태의 VSF는 그 활성을 나타내는 최소 단위가 100kD 이상의 거대물질임을 확인하였다(실시예 9). 활성분획을 SDS-PAGE로 분석하였을 때는 활성분획이 100kDa 이하의 크기를 갖는 수개의 단백질 밴드로 이루어져 있음을 알 수 있었는데, 항바이러스 활성은 500kDa 이상의 분획에서 가장 강하게 나타났다.

<33> 본 발명자들은 여러 가지 방법으로 본 발명의 항바이러스 활성을 분리하였다. 서로 다른 종류의 수지(resin)로 정제하여 얻어진 VSF 분획 중에 항바이러스 활성을 나타내는 분획에는 모두 SDS-PAGE에서 100kDa 이하의 4개의 단백질 밴드(band)들이 관찰되었다. 본 발명의 VSF를 구성하고 있는 구성 성분들은 비교적 강한 결합을 이루고 있는 것으로 생각된다.

<34> 본 발명에 따른 단백질 VSF는 다음과 같은 방법으로 제조할 수 있다.

<35> 한가지 양태로서, 본 발명에 따른 단백질 VSF는 뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMC-DV 바이러스로 면역세포를 자극하고, 상기 동물의 면역세포를 추출한 다음 이를 골

수중 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, 생성된 하이브리도마를 적절한 배지 및 조건하에서 배양하고, 그 배양액으로부터 분리 정제할 수 있다.

<36> 또한, 본 발명에 따른 단백질 VSF는 뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMC-DV 바이러스로 면역세포를 자극하고, 상기 동물의 면역세포를 추출한 다음 이를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, 생성된 하이브리도마를 동물에 주입하고, 주입 후 일정기간이 지난 다음 동물의 복수를 회수한 후 이로부터 분리 정제할 수 있다.

<37> 바이러스의 주입은 숙주세포에 생리적 장애가 유도되지 않으며 세포가 죽음에 이르지 않도록 적당한 용매, 예컨대 생리식염수 등으로 적절한 농도로 희석하고 복강내, 근육내, 안내 또는 피하 주사를 통해 투여한다. 투여량은 숙주에서 면역반응을 일으키기에 적합한 것으로 족하다. 바람직한 투여량은 0.1ml/마리 내지 2.0ml/마리이다. 투여 횟수는 동물에 1 내지 2주간 간격으로 2 내지 4회 정도 투여하는 방법이 일반적이다. 예를 들어 4회 바이러스를 투여할 경우, 투여 경로는 1,2,3회는 복강으로, 4회째는 정맥 주사를 통한다.

<38> 이렇게 하여 바이러스에 감염된 동물을 최종 바이러스 투여후 3일 내지 4일째에 해부하고, 적출한 비장에서 얻은 비장세포를 면역세포로서 사용한다. 면역세포와 세포융합하는 골수종 세포로는, 예컨대 p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3x63 Ag8, V653 및 S194등의 마우스 유래의 것이 사용될 수 있다. 또한, 랫트 유래 세포인 R-210 등의 세포주가 사용될 수 있다.

<39> 뇌심근염 바이러스의 변종 바이러스인 EMC-DV 바이러스를 세포에 주입하여 지속적으로 감염시킨 면역세포를 골수종 세포와 융합시켜 통상적인 방법에 의해 하이브리도마(hybridoma)를 제작한다. 상기 하이브리도마 배양액의 바이러스 억제능을 조사하여 가

장 우수한 하이브리도마를 선택한다. 하이브리도마의 제작에는 통상의 면역화학기술이 사용될 수 있고 특히, 마우스와 랫트를 사용할 수 있다.

<40> 면역세포와 골수종 세포와의 융합은 공지된 방법, 예컨대 코흘러(Koehler)와 밀스테인(Milstein)의 방법(Koehler et al.: Nature 256, 495~497, 1975)이 일반적으로 사용되지만, 전기펄스를 이용한 전기펄스법 등이라도 좋다. 면역 임파구와 골수종 세포주는 통상 행해지고 있는 세포수의 비율로 혼합하고, 일반적으로 사용되는 소 태아혈청(FCS) 불합류 세포배양용 배지에 폴리에틸렌글리콜을 첨가하여 융합처리를 하고, FCS첨가 HAT선택배지로 배양을 하여 융합세포(하이브리도마)를 선별한다. 연관된 관점으로 본 발명은 상기 단백질 VSF를 생산하는 하이브리도마를 제공한다. 본 발명의 하이브리도마는 부다페스트 조약하의 국제기탁기관인 한국세포주연구재단에 2001년 12월 21일 기탁번호 KCLRF-BP-00052로 기탁되었다.

<41> 상기 하이브리도마는 통상의 배양방법에 의해 계대배양 가능하고, 필요에 따라 동결보존할 수 있다. 하이브리도마를 통상법에 의해 배양하여 그 배양액을 회수하거나 또는 그 배양액을 포유동물의 복강내로 이식하여 복수(腹水)에서 VSF를 회수할 수 있다. 배양액 또는 복수중의 VSF는 염색법, 이온교환 및 겔여과 크로마토그래피, 친화성 컬럼 크로마토그래피 등 통상 사용되는 방법에 의해 정제할 수 있다. 바람직하게는, 블루 세파로스 친화성 컬럼 크로마토그래피, 수산화인회석 수지 크로마토그래피, 단백질 A 아가로스 친화성 크로마토그래피 등의 방법에 의해 정제할 수 있다.

<42> 구체적으로 블루 세파로스 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 본 발명에 따른 단백질 VSF를 분리 정제하는 방법은 다음과 같이 실시할 수 있다. 본 발명의 하이브리도마의 배양액 또는 복수의 상층액을 분당 0.1ml 내지 1.0ml의 유속으로 블루 세파로스 컬럼

(Blue Sepharose CL-6B resin column)에 통과시키고, 컬럼에 결합되지 않은 단백질은 10mM 내지 60mM의 염화나트륨을 포함한 pH 7.0 내지 pH 7.5의 인산나트륨 완충용액으로 세척한 후, 100mM 내지 300mM의 염화나트륨을 포함한 pH 7.0 내지 pH 7.5의 인산나트륨 완충용액을 가하여 VSF의 활성분획을 회수한다. 바람직하게는, 상기 배양액 또는 복수 상층액을 분당 0.5ml의 유속으로 20mM의 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer, pH 7.2)으로 충분히 균질화된 블루 세파로스 컬럼(Blue Sepharose CL-6B resin column)을 통과시켜 정제한다. 이때, 컬럼은 결합되지 않은 단백질의 흡광도가 백그라운드 수준으로 떨어질 때까지 50mM의 염화나트륨(NaCl)을 포함한 20mM의 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer, pH 7.2)으로 세척하고 200mM의 염화나트륨이 포함된 50mM의 인산나트륨 완충용액(pH 7.2)을 가하여 VSF의 활성 분획을 회수한다. 회수한 활성 분획을 농축기를 사용하여 탈염하고 농축한다.

<43> 또한, 본 발명에 따른 단백질 VSF는 단백질 A 아가로스 컬럼을 사용하여 분리 정제할 수 있다. 본 발명에 따른 하이브리도마의 배양 상층액 또는 복수의 상층액을 단백질 A 아가로스 컬럼에 분당 0.1ml 내지 1.0ml의 유속으로 통과시킨다. 컬럼에 결합되지 않은 단백질은 트리스 완충용액으로 세척하고, pH 4.0 내지 pH 5.0의 아세트산 완충용액을 사용하여 단백질 VSF의 활성분획을 용출한다. 용출된 단백질은 0.1M 내지 1.0M 인산나트륨 완충용액을 가하여 중화시킨다. 바람직하게는, 본 발명의 하이브리도마의 배양 상층액 또는 복수의 상층액을 단백질 A 아가로스 컬럼에 분당 0.5ml의 유속으로 통과시킨 다음 컬럼에 결합되지 않은 단백질은 흡광도가 백그라운드 수준으로 떨어질 때까지 0.1M 트리스 완충용액으로 세척한다. 여기에 pH 4.3의 아세트산 완충용액을 가하여 단백

질 VSF의 활성 분획을 용출한다. 용출된 단백질은 0.5M 인산 나트륨 완충용액(pH 7.7)을 가하여 중화시킨다.

<44> 본 발명에 따른 단백질 VSF는 수산화인회석 수지를 사용하여 다음과 같은 방법으로 분리 정제할 수 있다. 본 발명에 따른 하이브리도마의 배양 상층액 또는 복수의 상층액을 분당 0.5ml 내지 1.5ml의 유속으로 수산화인회석(hydroxyapatite) 수지로 충전된 컬럼에 통과시킨다. 컬럼에 결합하지 않은 단백질은 인산완충용액으로 충분히 세척하고, 50mM 내지 150mM, pH 7.0 내지 pH 7.5의 인산칼륨 완충용액을 가하여 단백질 VSF 활성분획을 회수한다. 회수한 활성분획은 농축기를 사용하여 탈염하고 농축한다. 바람직하게는, 수산화인회석(hydroxyapatite) 수지가 15ml 정도 충전된 컬럼을 1mM의 2-메캅토에탄올(mercaptoethanol)과 0.5mM의 EDTA가 포함된 2 mM의 인산완충용액(pH 7.2)으로 평형화시킨다. 여기에 본 발명의 시료를 분당 1ml씩 흘려준 다음 상기 컬럼 완충용액으로 충분한 세척한다. 여기에 100mM의 인산칼륨(pH 7.2)이 함유된 컬럼 완충용액으로 VSF 활성을 갖는 분획을 회수한다. 회수한 활성분획은 최종 인산칼륨(pH 7.2)농도가 2mM 될 때까지 농축기를 사용하여 탈염하고 농축한다.

<45> 본 발명은 단백질 VSF를 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 함유함을 특징으로 하는, 바이러스에 의한 동물의 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물을 제공한다.

<46> 치료학적 또는 예방학적 유효량은 투여대상, 연령, 개인차, 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료를 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제 및 안정화제를 혼합하여 사용할 수 있으며 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트포키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼(wafer)등의 형태로 제조할 수 있으며 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다.

<47> 본 발명에 따른 항바이러스 약제는 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등에 비경구적으로 사람과 동물에게 투여된다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내주사 및 정맥주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다. 이외에 본 발명 약학 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.

<48> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<49> <실시예>

<50> 실시예 1

<51> VSF(virus suppressing factor)를 생산하는 하이브리도마의 제작

<52> 생후 8주 지난 BALB/c(자성) 마우스 다섯 마리에 EMC 바이러스의 변종인 EMC-DV를 5×10^4 pfu/mouse의 농도로 복강 내에 주입하였다. 7일 후에 다시 10^7 pfu의 바이러스를 정맥 내로 주입하였다. 이후 4일이 경과한 후에 상기 마우스를 희생시켜 비장세포(spleen)를 적출하였다. 상기 비장세포와 골수종세포(myeloma, V653)를 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)을 매개로 하여 융합하였다.

<53> 획득한 융합세포 클론에 대하여 바이러스 억제 검사를 수행하여 항바이러스 활성이 우수한 세포주를 스크리닝하였다. 바이러스 억제 검사는 2% FBS가 함유된 DMEM(Gibco)을 사용하였다. 96-웰 플레이트의 한 웰 당 4 단계로 단계적 희석된 상기 배양액을 $50 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 여기에 5×10^4 개의 L세포(마우스 섬유아세포)를 분주하고, 1시간 배양한 다음 웰 당 100pfu (plaque-forming unit)의 EMC 바이러스를 넣어 최종 배양부피를 $200 \mu\text{l}$ 로 조절하여 충분한 습도의 37°C 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양이 완료되면, 배양액을 제거한 후에 $150 \mu\text{l}$ 의 10% 포름알데히드 (formaldehyde)를 첨가하고 상온에서 10분간 고정하였다. 여기에 1%의 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 용액을 $50 \mu\text{l}$ 넣고 상온에서 10분간 염색하였다. 염색이 완료되면, 모든 용액을 제거하고 흐르는 물에 가볍게 세척하여 배경염색을 제거한 후 세포의 염색정도를 조사하여 세포의 생존 정도를 측정하였다. 바이러스의 증식이 억제되어 세포가 완전히 생존하게 되면 고른 층을 형성함과 동시에 크리스탈 바이올렛에 염색되어 배양면이 고르게 염색되지만, 바이러스의 감염에 의하여 세포가 죽는 경우에는 세포 배양면이 염색되지 않거나 매우 불규칙하게 염

색된다. 또한, 병행하여 세포의 대사량을 측정하는 MTS (

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-c

arboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, Promega)를 사용

하여 바이러스 억제정도를 조사하였다. 제작사의 제안된 사용법에 따라, 해당 세포를

10⁴개씩 96-웰 플레이트에 분주하고, VSF를 여러 농도로 처리하면서 동시에 테스트하고

자하는 바이러스를 처리하였다. 바이러스의 생활사에 따라 일정시간이 지난 후에 MTS

혼합용액을 20 μ l씩 넣고 490nm에서의 흡광도를 측정하고, 다량의 세포가 생존해 있을수

록 강한 흡광도를 나타내게 되는 점을 이용하여 생존도로 환산하였다.

<54> 실험 결과, 항바이러스 활성이 우수한 융합세포주 4D1B를 획득하였으며 이를 부다페스트 조약하의 국제기탁기관인 한국세포주연구재단에 2001년 12월 21일자로 기탁번호 KCLRF-BP-00052로 기탁하였다.

<55> 실시예 2

<56> 복수의 생산

<57> 상기 실시예 1에서 얻어진 하이브리도마 4D1B(기탁번호 KCLRF-BP-00052)를 2% FBS가 포함된 DMEM배지에 접종하여 5%의 CO₂가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양된 융합세포를 마우스 당 1 \times 10⁷ 내지 2 \times 10⁷개씩 복강 내에 주입하였다. 주입 후 2주를 전후로 하여 마우스에 복수가 차오르면 이를 회수하였고, 회수된 복수를 1500 \times 로 원심분

리하여 상층액을 얻어내었다. 이렇게 얻어진 상층액도 상기한 바와 마찬가지로 소량씩 나누어 -70°C 에 보관하였고, 필요에 따라 녹여 사용하였다.

<58> 실시예 3

<59> 본 발명에 따른 VSF의 프로테아제에 대한 영향

<60> 본 발명에 따른 VSF가 프로테아제(protease)에 의하여 영향을 받는 정도를 조사하였다.

프로테아제는 30units/mg의 특이활성을 지닌 프로테아제 K를 사용하였다. 실시예1에서 스크리닝한 하이브리도마 4D1B(기탁번호 KCLRF-BP-00052)를 5 SFM(serum-free media; Gibco)에 접종하여 5%의 CO_2 가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 상기 배양액에 프로테아제 K를 각각 1, 2, 4mg/ml를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시켰으며, 또한, 트립신(trypsin) 1mg/ml를 첨가하여 3시간 동안 반응시켰다. 이 때 사용된 트립신은 10,000 BAEE unit /mg protein 의 활성을 가진것이다. 반응이 완료된 배양액의 항바이러스 활성을 상기 실시예 1에서 기술한 크리스탈 바이올렛 염색법과 MTS 검정법으로 조사하였다.

<61> 실험 결과, 프로테아제 K의 경우에는 가장 최소량으로 처리하였을 때에도 본 발명에 따른 VSF의 항바이러스 활성이 상실되었다. 반면, 트립신으로 처리한 경우에는 항바이러스 활성이 남아있음이 관찰되었다. 이로부터 본 발명의 VSF가 프로티나제 K에 매우 민감한 단백질로 구성되어 있거나, 또는 VSF를 구성하는 단백질의 일부가 프로테아제 K에

매우 민감한 특성을 지님을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 VSF를 구성하는 단백질은 프로테아제 K와 트립신에 대한 민감도가 차이가 있음을 알 수 있었다.

<62> 실시예 4

<63> 본 발명에 따른 하이브리도마의 역전사 중합효소연쇄반응을 통한 특정 사이토카인의 발현여부 조사

<64> 본 발명에 따른 단백질 VSF를 분비하는 하이브리도마 4D1B(기탁번호 KCLRF-BP-00052)가 특정 사이토카인을 발현하는지를 조사하고자 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 실시하였다. 실시예 1의 하이브리도마를 제작하는데 사용했던 쥐의 비장세포와 바이러스 억제활성이 없는 하이브리도마를 대조군으로 하여 다음과 같은 방법으로 RT-PCR를 실시하였다.

<65> 트리졸 시약(Trizol reagent, Gibco-BRL)을 이용하여 상기 세포주들의 RNA를 추출하였으며, 역전사반응에 필요한 시약은 프로메가(Promega)사 제품을 이용하였다. 멸균된 마이크로튜브에 RNA 5 μ g, 5X 역전사효소 완충용액(reverse transcriptase buffer) 8 μ l, 10mM dNTP 8 μ l, Oligo(dT) 100pmole, RNasin 40units, MMLV 역전사효소 200units를 분주한 다음 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리한 멸균수를 첨가하여 최종부피가 40 μ l 되도록 하였다. 이를 42℃에서 1시간 그리고 95℃에서 3 분간 처리하여 역전사반응물을 생성하였다.

<66> 상기 역전사반응물과 시발체를 반응시켜 중합반응물을 생성하였다. 중합반응에 사용한 시발체(Bioneer)는 표 1에 나타난 바와 같으며, 인터루킨(IL), 인터페론(IFN), 종양괴사인자(TNF), 전환성장인자(TGF) 및 콜로니자극인자(CSFs)와 같은 사이토카인을 증폭시

킬 수 있는 것들이다. 프리믹스 튜브에 역전사반응물 $1\mu\text{l}$, 정방향 시발체 10pmole, 역방향 시발체 10pmole을 분주한 다음 멸균수를 첨가하여 최종부피가 $20\mu\text{l}$ 되도록 하였다. 이를 94°C 3분 1회, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분 반복 45회, 72°C 3분 1회 처리하여 중합반응물을 생성하였다.

<67> 【표 1】

RT-PCR에 사용된 시발체

| 시발체 이름 | 염기서열 | 시발체 이름 | 염기서열 |
|------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| IL-1aF | cagcaccttacacctaccagag | IL-1aR | ctggaagtctgtcatagagg |
| IL-1bF | gcagctatggcaactgttcc | IL-1bR | ggaagacacagattccatggtg |
| IL-2F | atgtacagcatgcagctcgc | IL-2R | gagggttgttgagatgatgc |
| IL-3F | atggttcttgccagctctaccac | IL-3R | ttaacattccacggttccacgg |
| IL-4F | atgggtctcaacccccagctag | IL-4R | gatgctctttaggctttccagg |
| IL-5F | cagagtcacatgagaaggatgc | IL-5R | tcagccttccattgcccactctg |
| IL-6F | gaagttcctctctgcaagag | IL-6R | ctagggttgccgagtagatctc |
| IL-7F | cgcagaccatgttccatgtttc | IL-7R | ggagggttggttactacatgtcctg |
| IL-9F | ggtgacatacatccttgccic | IL-9R | tcattggtcggttttctgcc |
| IL-10F | atgcctggctcagcactgctatg | IL-10R | catggcctttagacaccttg |
| IL-11F | atgaactgtgtttgtcgccctgg | IL-11R | tcccgagtccagtcgagtc |
| IL-12aF | atgtgtcaatcacgctacctcctc | IL-12aR | tcaggcggagctcagatagc |
| IL-12bF | atgtgtcctcagaagctaacc | IL-12bR | atcctaggatcggacctgic |
| IL-13F | ttcatggcgctctgggtgac | IL-13R | tcattagaaggggcccgtggc |
| IL-15F | gaggaatacatccatctcgtgc | IL-15R | cagt caggacgtgttgatgaac |
| IL-16F | cacggttcacagagtgtttcc | IL-16R | ctatgagtctgcagaagctg |
| IL-17F | atgagtcaggagagagcttc | IL-17R | ttaggctgctggcggacaatc |
| IL-18F | atggctgccatgtcagaagac | IL-18R | gcacatcttcttttggcaagc |
| G-CSFF | atggctcaactttctgccag | G-CSFR | ctaggccaagtgggtgcagagc |
| GM-CSFF | tgaggaggatgtggctgcag | GM-CSFR | gcttctcatttttggactgg |
| TNF- α F | atgagcacagaaagcatgatccg | TNF- α R | cttcacagagcaatgactcc |
| TNF- β F | atgacactgctcggccgtct | TNF- β R | gaatctacagtgcagggtcc |
| IFN- α F | cataatggctaggccctttgc | IFN- α R | tcactccttctcctcactcag |
| IFN- β F | atgaacaacaggtggatcctcc | IFN- β R | ctgacaggtcttcagtgttgg |
| IFN- γ F | atgaacgctacacactgcac | IFN- γ R | tcagcagcagactccttttc |
| TGF- β F | gcgctcactgctcttgtgac | TGF- β R | ttcagctgcacttgcaggag |
| RANTESF | atgaagatctctgcagctgcc | RANTESR | cctctatcctagctcatctcc |
| MIP-1 α F | atgaaggtctccaccactgc | MIP-1 α R | ctcaggcatctcagttccagg |
| MIP-1 β F | atgaagctctgcgtgtctgc | MIP-1 β R | ctggagctgctcagttcaac |
| MIP-1 γ F | atgaagccttttcatactgccc | MIP-1 γ R | gttattgtttgtaggccgtgg |
| MCP-1F | atgcaggtccctgtcatgcttc | MCP-1R | ctagttcactgtcacactggctc |
| MCP-3F | atgaggatctctgccacgttc | MCP-3R | cttcaaggctttggagttgggg |
| IP-10F | atgaaccaagtgtgcccgt | IP-10R | cagtttaaggagcccttttagacc |
| LymphotactinF | atgagacttctcctcctgac | LymphotactinR | ctgttaccagctcagggtta |
| GapdhF | tgatgggtgtgaaccacagag | GapdR | cttactccttggaggccatg |

<68> 실험 결과, 본 발명의 VSF를 분비하는 하이브리도마에서 특징적으로 발현되는 사이토카인은 없었으며 이러한 결과는 반복 실험을 통하여 동일하게 재연되었다(표 2, 0: 사이토

카인이 발현됨). 이 결과는 본 발명의 VSF가 종래에 알려진 사이토카인으로 구성된 것이 아니며 따라서, 신규한 것임을 알 수 있었다.

<69> 【표 2】

RT-PCR 결과 발현된 사이토카인

| No. | 사이토카인종류 | 염기쌍 | 비장세포 | 대조군 하이브리도마 | 본 발명의 하이브리도마 |
|-----|----------------|------|------|------------|--------------|
| 1 | IL-1 α | 461 | 0 | | |
| 2 | IL-1 β | 813 | 0 | | |
| 3 | IL-2 | 505 | | | |
| 4 | IL-3 | 501 | | | |
| 5 | IL-4 | 402 | 0 | | |
| 6 | IL-5 | 409 | | | |
| 7 | IL-6 | 634 | 0 | | |
| 8 | IL-7 | 497 | 0 | | |
| 9 | IL-9 | 430 | 0 | | |
| 10 | IL-10 | 474 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | IL-11 | 607 | | | |
| 12 | IL-12a | 648 | | | |
| 13 | IL-12b | 1011 | | | |
| 14 | IL-13 | 402 | | 0 | 0 |
| 15 | IL-15 | 469 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | IL-16 | 574 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | IL-17 | 477 | | | |
| 18 | IL-18 | 497 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | G-CSF | 627 | | | |
| 20 | GM-CSF | 440 | | | |
| 21 | TNF- α | 710 | 0 | | |
| 22 | TNF- β | 613 | 0 | | |
| 23 | IFN- α | 577 | | | |
| 24 | IFN- β | 560 | | | |
| 25 | IFN- γ | 468 | 0 | | |
| 26 | TGF- β | 516 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | RANTES | 284 | 0 | 0 | |
| 28 | MIP-1 α | 280 | 0 | | |
| 29 | MIP-1 β | 289 | 0 | | |
| 30 | MIP-1 γ | 370 | 0 | | |
| 31 | MCP-1 | 447 | 0 | | |
| 32 | MCP-3 | 296 | | 0 | |
| 33 | IP-10 | 300 | 0 | 0 | |
| 34 | Lymphotactin | 348 | 0 | | |
| 35 | Gapdh | 615 | 0 | 0 | 0 |

<70> 실시예 5

<71> 블루 세파로스 컬럼 크로마토그래피를 이용한 VSF의 정제

<72> 하이브리도마 4D1B(KCLRF-BP-00052)를 20%의 FBS가 포함된 DMEM에서 배양한 다음 SFM(serum-free medium) 또는 PFM(protein-free medium) 배지로 단계적으로 교체하였다. 2일 간격으로 새로운 배지로 교체하였고, 배양액을 회수한 다음 1500×로 원심분리하여 세포조각을 제거하였다.

<73> 세포조각이 제거된 상층액을 분당 0.5ml의 유속으로 블루 세파로스 컬럼(Blue Sepharose CL-6B resin column)을 통과시켜 정제하였다. 이때, 50mM의 염화나트륨(NaCl)을 포함한 20mM의 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer, pH 7.2)으로 비특이적 작용 물질들을 제거하고, 200mM의 염화나트륨이 포함된 50mM의 인산나트륨 완충용액(pH 7.2)을 가하여 VSF의 활성 분획을 회수하였다.

<74> 실시예 6

<75> 단백질 A 친화성 컬럼 크로마토그래피를 이용한 VSF의 정제

<76> 하이브리도마 4D1B(KCLRF-BP-00052)를 20%의 FBS가 포함된 DMEM에서 배양한 다음 SFM(serum-free medium) 또는 PFM(protein-free medium) 배지로 단계적으로 교체하였다.

2일 간격으로 새로운 배지로 교체하였고, 배양액을 회수한 다음 1500×g로 원심분리하여 세포조각을 제거하였다.

<77> 단백질 A 아가로스 비드(Sigma, P-2545)를 이용하여 친화성 컬럼을 제조하고, 상기 세포조각을 제거한 상층액을 분당 0.5ml씩 흘려주었으며, pH4.3의 아세트산 완충용액을 사용하여 바이러스 억제인자의 활성 분획을 회수하였다.

<78> 실시예 7

<79> 수산화인회석 컬럼 크로마토그래피를 이용한 VSF의 정제

<80> 하이브리도마 4D1B(KCLRF-BP-00052)를 20%의 FBS가 포함된 DMEM에서 배양한 다음 SFM(serum-free medium) 또는 PFM(protein-free medium) 배지로 단계적으로 교체하였다. 2일 간격으로 새로운 배지로 교체하였고, 배양액을 회수한 다음 1500×g로 원심분리하여 세포조각을 제거하였다.

<81> 세포조각을 제거한 상층액을 수산화인회석(hydroxyapatite) 수지가 충전된 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 상기 컬럼을 1mM의 2-메캅토에탄올 (mercaptoethanol)과 0.5mM의 EDTA가 포함된 2mM의 인산완충용액(pH 7.2)으로 평형화시키고 상기 시료를 분당 0.5ml씩 흘려주었으며 상기 컬럼 완충용액으로 충분한 세척을 한 후에 100mM의 인산칼륨(pH 7.2)이 함유된 컬럼 완충용액으로 VSF 활성을 갖는 분획을 회수하였다.

<82> 실시예 8

<83> 본 발명에 따른 VSF의 활성분획의 SDS-PAGE 분석

<84> 상기 실시예 5에서 획득한 본 발명에 따른 VSF의 활성분획을 SDS-PAGE로 분석하였고 항마우스 IgG 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅하였다. 활성이 있는 각 분획을 5 μ l씩 취하여 동일 부피의 2X SDS 시료 완충액과 혼합하고 5분간 끓인 다음, 냉각시켜서 12 % SDS-PAGE 하고 통상적 방법인 코마시 블루 염색약으로 염색하고 아세트에시드-메탄을 혼합액으로 탈색하여 단백질 분리를 확인하였다. 또한, 상기 방법으로 SDS-PAGE하고 니트로셀룰로즈 막에 옮기고 그 막을 증류수로 세척하여 건조시켰다. 이어 블로토(Blotto, TBS(tris-buffered saline))에 용해된 5%의 탈지분유)로 1.5시간 블로킹시키고 TBS로 세척하여 건조시킨 다음 AP(alkaline phosphatase)가 결합된 고우트안티-마우스 IgG(Goat anti-mouse IgG)를 첨가하여 1시간 반응시키고 10분 간격으로 트윈 20을 포함한 TBS로 세 번 세척하였다. 그런 다음, AP 완충액(5mM MgCl₂를 함유한 100mM 트리스 완충용액, pH 9.5)으로 10분 동안 마지막 세척하였다. 70% 디메틸포름아마이드(dimethylformamide)와 50mg/ml 니트로블루 테트라졸리움(nitroblue tetrazolium)으로 구성된 용액 66 μ l 및 100% 디메틸포름아마이드(dimethylformamide)와 50mg/ml 브로모클로로인돌 포스페이트(bromochloroindolyl phosphate)로 구성된 용액 30 μ l를 포함하는 최종부피 10 ml 의 AP 완충용액으로 발색을 유도하였다. 발색반응이 적당한 강도에 이르렀을 때 증류수로 여러 차례 세척함으로써 반응을 정지시켰다.

<85> 실험 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 세 가지의 서로 다른 성질을 지닌 컬럼으로 정제된 활성 분획들의 주요 밴드들이 거의 일치하게 나타났다. 약 6개의 밴드가 관찰되었으며, 이중 2개의 밴드는 확대 그림상에서 이중 밴드(doblet)로 확인되었다. 따라서, 비록 단백질 A 아가로스 수지를 통하여 정제된 경우가 있지만 여기에서 회수된 물질들이

단순한 항체의 일종이 아니라 항체 유전자군 (immunoglobulin super-family)의 일원이거나 또는 본 발명에 따른 VSF의 작용에 항체의 일부가 보조적으로 요구된다고 생각된다.

<86> 실시예 9

<87> 본 발명에 따른 VSF의 분자량

<88> 본 발명에 따른 VSF의 분자량을 예측하기 위하여 센트리콘(Centricon™)을 사용하였다. 아미콘(Amicon™)에서 생산되는 센트리콘 중 각각 투과분자량이 30, 50, 100 및 500kD에 해당되는 것을 사용하였는데 상기 실시예 6 내지 실시예 8에서 정제된 VSF에 대하여 작은 투과분자량을 나타내는 것부터 사용하였고, 5000×로 원심분리하였다. 투과되어 나온 물질을 별도로 보관하고, 투과되지 않은 것은 한 단계 큰 분자량의 투과를 허용하는 센트리콘을 사용하여 반복 실험하였다. 이렇게 하여 얻어진 최종 산물들에 대하여 항바 이러스 활성정도는 실시예 1에서 기술한 방법으로 측정하였으며 동시에 SDS-PAGE 분석을 통하여 주요 물질의 존재를 확인하였다.

<89> 실험 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이 VSF 활성은 분자량 500kDa 이상, 100-500kDa 사이에 존재하며, 일부만이 100kDa 이하의 분획에 존재함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 현상은 도 1에 나타낸 바와 같이 SDS-PAGE 결과에서도 일치되었다. 주요 밴드들은 500kDa의 센트리콘을 통과하지 않은 것으로 나타났으며, 상대적으로 적은 양의 물질들이 100kDa 내지 500kDa 사이에 존재하였다. 이는 비록, VSF의 구성 물질 개개의 크기에 대해 확인할 수는 없지만 VSF의 구성 물질들은 올리고머를 형성하여 실제 상태에서는 최

소한 100kDa 이상의 거대 집합체를 형성하고 이것이 활성을 나타내는 최소의 단위가 됨을 알 수 있었다. 또한, 기존에 보고된 CAF의 경우에는 상기한 방법을 통하여 30kDa 전후이거나 그 미만이라고 알려져 있으므로, 본 발명에서 제시된 VSF는 CAF와 전혀 다른 물질이라 할 수 있다. 아울러, 기존에 알려진 항바이러스성 사이토카인의 크기들이 대부분 100kDa 이하인 점을 감안한다면, VSF의 구성 성분에 기존에 알려진 항바이러스성 사이토카인이 포함되어 있지 않음을 추론할 수 있었다.

<90> 【표 3】

본 발명에 따른 VSF의 분자량

| 크 기 | VIT# | 단백질 농량(mg/ml) |
|--------------|-------|---------------|
| 500 kD 이상 | 1,024 | 0.32 |
| 100 - 500 kD | 256 | 0.2 |
| 50 - 100 kD | 1 | 0.14 |

<91> VIT# : 바이러스 억제검사, 항바이러스 활성을 관찰할 수 있는 최대 희석 배수

<92> 실시예 10

<93> 본 발명에 따른 VSF의 EMC 바이러스 및 Mengo 바이러스에 대한 항바이러스 활성

<94> 본 발명에 따른 하이브리도마 4D1B(KCLRF-BP-00052)의 배양액 또는 실시예 2에서 제조한 복수액을 이용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 EMC 바이러스 및 Mengo 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 조사하였다.

<95> 실험 결과, 표 4에 나타난 바와 같이 본 발명의 VSF에 의하여 EMC 바이러스와 Mengo 바이러스의 증식이 강력하게 억제됨을 알 수 있었다. 세포 배양액 상태의 VSF는 4096배 이상 희석되어도 항바이러스 활성이 남아 있었으며, 복수 상태의 VSF는 마우스마다 약간의 차이가 있으나 100만배 이상 희석하여도 항바이러스 활성이 잔존하였다. 이는 병행으로 수행된 MTS 검정법에 의해 분석된 결과에서도 동일하게 나타났다(도 3).

<96> 종래에 알려진 CAF의 경우에는 최고 10배의 희석까지만 활성이 남아 있는 것으로 보고되었는데(Walker CM et al., Immunology, 66, 628-630 (1989), Carl EM et al., PNAS, 92, 2308-2312 (1995)), 이에 비하여 VSF는 대단히 강력한 항 바이러스 작용을 나타냄을 알 수 있다. 또한, 가장 높은 농도의 VSF로 처리된 세포에서도 어떠한 세포독성이 관찰되지 않아서, VSF의 작용이 바이러스 감염된 세포의 사멸에 기인하는 것이 아님을 알 수 있으며 생체 독성이 매우 낮음을 알 수 있었다.

<97> 【표 4】

여러 형태의 VSF에 의한 EMC 바이러스 및 Mengo 바이러스의 증식 억제

| | 배양액 | 복수 A | 복수 B | 복수 C | 복수 D |
|------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| VIT# | 2,048 | 1,048,576 | 1,048,576 | 4,194,304 | 1,048,576 |

<98> VIT# : 바이러스 억제검사, 항바이러스 활성을 관찰할 수 있는 최대 희석 배수

<99> 실시예 11

<100> 본 발명에 따른 단백질 VSF의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성

<101> 본 발명에 따른 VSF를 분비하는 하이브리도마 4D1B(KCLRF-BP-00052)를 배양한 세포 배양액 또는 실시예 2에서 제조한 복수액의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성

을 조사하였다. 배양 후 8일 지난 수정란(embryonated egg)에 인플루엔자 바이러스를 접종하였다. 먼저, 검란을 실시하여 혈관 발생이 없는 부위를 접종장소로 선택한 후 난각 표면을 소독하였다. 접종 부위의 난각 및 난각막만을 뚫어 구멍을 낸 후, 미세주사기를 사용하여 바이러스를 요낭막강에 접종하였다. 바이러스 접종 부위의 구멍은 촛농으로 봉하였다. 이때 사용되는 바이러스의 접종량은 계란당 1HAU (hemmagglutination unit)이었으며, 본 발명에 따른 하이브리도마를 배양한 세포배양액 또는 복수액을 $10\mu\text{l}$ 내지 $200\mu\text{l}$ 씩 접종하였다. 접종 후, 섭씨 34°C 에서 2일이 지나면 계란 중 일부를 섭씨 4°C 에서 밤새 보관한 후에 껍질을 제거하여 배아 외의 요낭막강액을 수거하였다. 나머지 계란은 3일 동안 배양한 후에 껍질을 제거하여 배아의 생존여부를 관찰하였다. 수거된 요낭막강액에 대한 혈구응집반응(hemmagglutination assay)을 실시하였다. 인산완충 식염수를 사용하여 요낭막강액을 여러 단계로 단계희석하였다. 여기에 동일한 부피의 닭혈구 부유액 (0.5 %)을 넣고 실온에 30분 이상 정치시켰다. 바이러스에 의한 혈구응집반응이 일어나면 시험관의 바닥에 얇은 응집혈구막이 형성되었다. 이러한 방법으로써 인플루엔자 바이러스의 증식정도를 확인하였다.

<102> 실험 결과, VSF 분비 세포의 배양 상층액과 복수에 포함된 VSF 모두 인플루엔자 바이러스의 증식을 효과적으로 억제하며 그에 따라 배아의 생존율을 높이는 효과가 있음을 확인하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 세포배양액 상태의 VSF가 같이 접종되었을 경우, 바이러스의 증식이 접종된 VSF의 양에 반비례하여 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 복수 상태의 VSF의 접종으로도 바이러스의 증식이 효과적으로 억제함을 관찰하였으며 단백질 VSF가 수정란의 성장에는 어떠한 해로운 영향도 없음이 확인되었다.

<103> 실시예 12

<104> 본 발명에 따른 단백질 VSF의 HIV 바이러스에 대한 항바이러스 활성

<105> 10^4 개의 SupT1 세포(사람 T 세포주의 일종, Smith SD et al., Cancer Research, 44, 5657-5660, (1984))에 약 10^3 TCID₅₀의 HIV-1(NL strain)을 감염시켰다. 바이러스 감염과 동시에 실시예 2에서 제조한 복수액을 여러 희석배수로 처리하였다. 상기 세포를 FBS(fetal bovine serum)가 10% 함유된 RPMI1640 배지(Gibco)에서 5%의 CO₂를 공급하면서 37℃로 배양하였다. 바이러스의 증식정도는 감염 후 4 내지 5일 사이에 형성되는 거대세포(syncytia)를 관찰함으로써 분석하였다.

<106> 실험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 바이러스 감염과 동시에 VSF가 포함된 복수액을 처리한 경우에, 거대세포가 복수액의 양에 따라서 반비례하여 감소함을 확인하였다. 또한, 본 발명의 VSF를 포함하는 복수액은 세포의 증식에 어떠한 해로운 영향도 없으며, 세포 증식이 다른 세포와 전혀 차이가 없음이 확인되었다.

<107> 실시예 13

<108> 본 발명에 따른 단백질 VSF의 EMC 바이러스에 의한 당뇨병 유발 억제 활성

<109> SJL/J 마우스에 EMC 바이러스를 감염시키면 당뇨가 유발되는데, 이러한 현상이 VSF에 의하여 억제되는 여부를 관찰하였다. 생후 9 주째인 SJL/J 마우스(웅성)를 본 발명에

다른 VSF의 투여여부 및 투여시기에 따라 6마리씩 5그룹으로 분류하였다. 첫 번째 그룹은 VSF만을 투여하였으며, 두 번째 그룹은 EMC-D 바이러스만을 투여하였다. 세 번째 그룹은 EMC-D 바이러스의 투여와 동시에 VSF를 함께 투여하였으며, 네 번째 그룹은 EMC-D 바이러스를 투여한 다음, 4시간이 경과한 뒤에 VSF를 투여하였다. 다섯 번째 그룹은 EMC-D 바이러스를 투여한 다음, 24시간이 경과한 뒤에 VSF를 투여하였다. EMC-D 바이러스의 투여량은 10^4 pfu(0.5ml)로 복강 주입하여 감염시켰다. VSF는 0.5ml씩 꼬리정맥을 통하여 1차례 주입하였다. 감염 2 일째 되는 날부터 각 그룹 마우스의 소변을 매일 채취하여 당뇨 상태를 검사하였다.

<110> 실험 결과, 표 5 및 도 7에 나타낸 바와 같이 VSF만을 투여한 첫 번째 그룹은 아무런 질환의 징후가 나타나지 않았다. 따라서, VSF가 생체내에서 별다른 독성이나 부작용을 나타내지 않을 것으로 예상된다. EMC-D 바이러스만을 투여한 두 번째 그룹은 4일 만에 6마리 모두에 심각한 당뇨가 나타나기 시작하였으며 체중감소가 수반되었다. 또한, 10 일째에 6마리 중 2마리가 사망하였다. 바이러스 투여와 동시에 VSF를 투여한 세 번째 그룹은 당뇨가 검출되지 않았으며 건강 상태도 양호하였다. 바이러스 투여 후 4시간이 경과한 뒤에 VSF를 투여한 네 번째 그룹도 역시 당뇨가 전혀 검출되지 않았고 건강상태도 지극히 양호하였다. 바이러스 투여 후 24시간이 경과한 뒤에 VSF를 투여한 다섯 번째 그룹도 마찬가지로 당뇨가 검출되지 않았으며 체중감소도 나타나지 않았다.

<111> 이는 본 발명에 따른 VSF가 시험관내(*in vitro*)에서 뿐만 아니라 생체내(*in vivo*)에서도 강력한 항 바이러스 작용을 한다는 사실을 입증하는 것이다. 기존에 보고되었던 CAF의 경우에는 많이 희석되면 활성이 급격히 감소하여 생체실험 자체가 거의 불가능하고,

인터페론은 생체 외부에서 주입될 경우에는 생체 자체적으로 생산되었을 때에 비하여 그 활성이 현저히 떨어지는 문제점이 있다. 본 실시 예에서 제시하는 결과는 VSF가 0.5ml의 세포 배양액 상태로도 EMC 바이러스에 의한 당뇨병의 발병을 완벽하게 차단한 것이며, 또한 VSF의 *in vivo* 부작용이 거의 없음을 의미하므로 향후 신약으로서의 개발에 매우 높은 가능성이 있음을 나타낸다.

<112> 한편, 바이러스 감염 24시간 전에 투여된 VSF에 의해서도 당뇨의 발병과 체중감소 등이 완벽하게 억제되는 현상이 관찰되었는데, 이는 VSF의 항바이러스 치료뿐 아니라, 예방제로서의 가능성까지 제시한다.

<113> 【표 5】

EMC-DV 바이러스를 투여한 마우스에서 VSF의 투여여부 및 투여시기에 따른 당뇨의 발병

| | 감염 직전 | 감염 후 3일 | 감염 후 4일 | 감염 후 1주일 |
|------|-------|---------|---------|----------|
| 그룹 1 | - | - | - | - |
| 그룹 2 | - | - | 6/6 | 6/6 |
| 그룹 3 | - | - | - | - |
| 그룹 4 | - | - | - | - |
| 그룹 5 | - | - | - | - |

<114> 실시예 14

<115> 본 발명에 따른 단백질 VSF에 의한 HCMV의 증식 억제

<116> 본 발명에 따른 VSF를 분비하는 하이브리도마 4D1B를 배양한 세포 배양액의 인간 싸이토메갈로바이러스(Human Cytomegalovirus, HCMV)에 대한 항바이러스 활성을 조사하였다.

실시에 1에서 기술한 바와 같은 방법으로써 하이브리도마 4D1B를 배양한 세포 배양액을 여러 단계로 희석하여 인간 싸이토메갈로바이러스가 배양되는 상태에 처리하였다.

<117> 그 결과, 4D1B 배양액이 4 내지 16 배로 희석되어도 100 pfu의 인간 싸이토메갈로바이러스가 증식하는 것을 완전하게 저지함이 관찰되었다. 따라서, VSF가 다양한 바이러스에 항바이러스 활성을 나타냄이 다시 한번 확인되었다.

【발명의 효과】

<118> 본 발명에 따른 VSF는 지금까지 보고된 바 없는 신규한 단백질로서 여러 종류의 바이러스에 대해 강력한 항바이러스 효과가 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

(a) 뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMV-DV에 의해 자극을 받은 면역세포에서 그 생산이 증가되며,

(b) 항바이러스 활성이 있고,

(c) 프로테아제 K에 의해 불활성화되며,

(d) 항바이러스성 사이토카인인 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ , MCP-1, MCP-3, IP-10, 및 림포타틴(lymphotactin)이 아니며,

(e) 몇 개의 단백질 서브 유니트들이 공유결합 또는 비공유결합을 이루고 있는 형태로 분자량이 약 100kD 이상임을 특징으로 하는 단백질 VSF.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 항바이러스 활성은 오소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 속 바이러스, 피코르나리비데(Picornaviridae) 속 바이러스 레트로비리데(Retroviridae) 속 바이러스 또는 헤르페스(Herpes) 속 바이러스의 증식 또는 복제를 억제하는 것임을 특징으로 하는 단백질 VSF.

**【청구항 3】**

뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMC-DV에 의해 자극을 받은 면역세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, 생성된 하이브리도마의 배양액으로부터 분리됨을 특징으로 하는 단백질 VSF.

【청구항 4】

뇌심근염 바이러스의 변종바이러스인 EMC-DV에 의해 자극을 받은 면역세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, 생성된 하이브리도마를 동물에 주입하고, 주입 후 일정기간이 지난 다음 회수한 동물의 복수로부터 분리됨을 특징으로 하는 단백질 VSF.

【청구항 5】

제 3항 또는 제 4항의 어느 한 항에 있어서, 상기 배양액 또는 복수를 블루 세파로스 컬럼으로 분리하는 것을 특징으로 하는 단백질 VSF.

【청구항 6】

제 3항 또는 제 4항의 어느 한 항에 있어서, 상기 배양액 또는 복수를 단백질 A 아가로스 컬럼으로 분리하는 것을 특징으로 하는 단백질 VSF.

【청구항 7】

제 3항 또는 제 4항의 어느 한 항에 있어서, 상기 배양액 또는 복수를 수산화인회석 수지 컬럼으로 분리하는 것을 특징으로 하는 단백질 VSF.

【청구항 8】

단백질 VSF를 생산하는 것을 특징으로 하는 하이브리도마.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 하이브리도마가 하이브리도마 4D1B(기탁번호 KCLRF-BP-00052)인 하이브리도마.

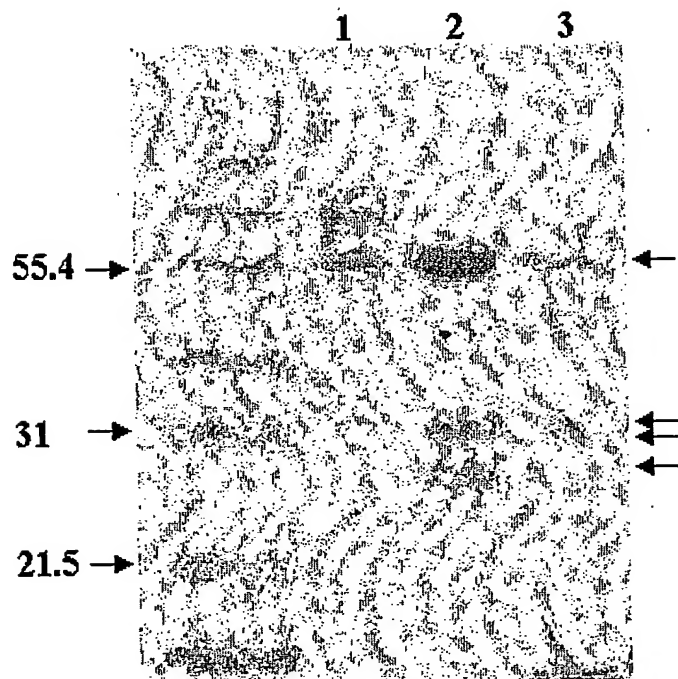
【청구항 10】

제 1항 내지 제 9항의 어느 한 항에 따른 단백질 VSF를 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 함유함을 특징으로 하는 바이러스에 의한 사람 및 동물의 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

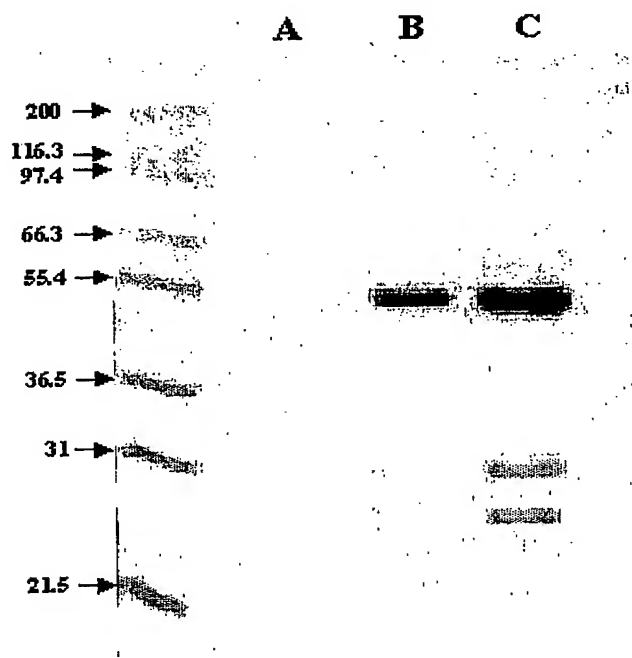


【도면】

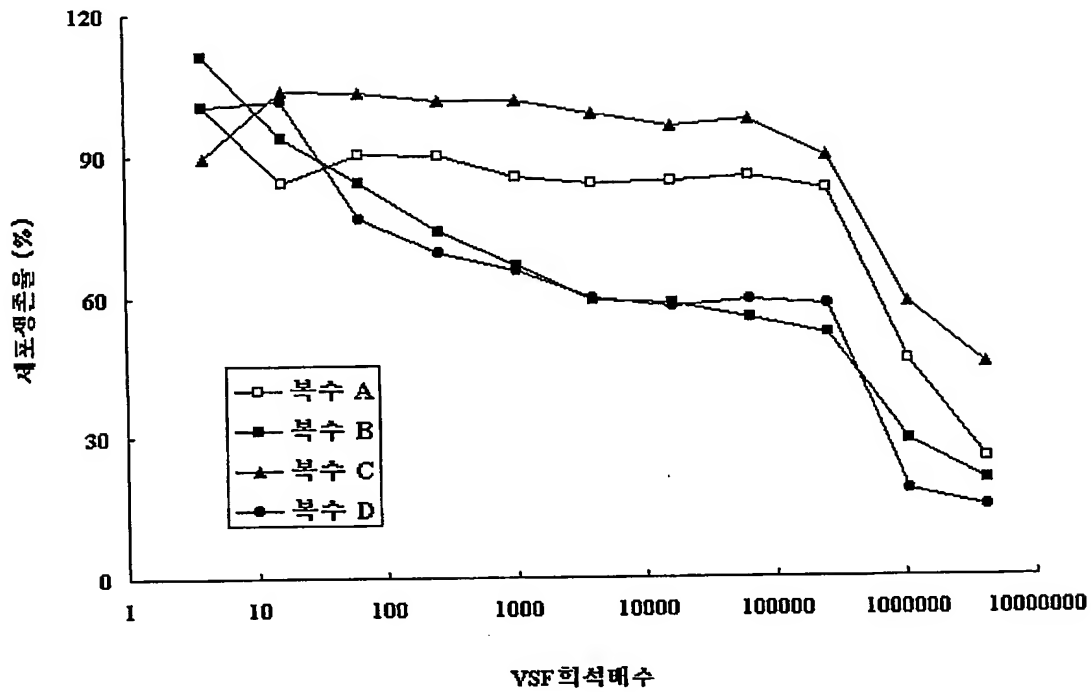
【도 1】



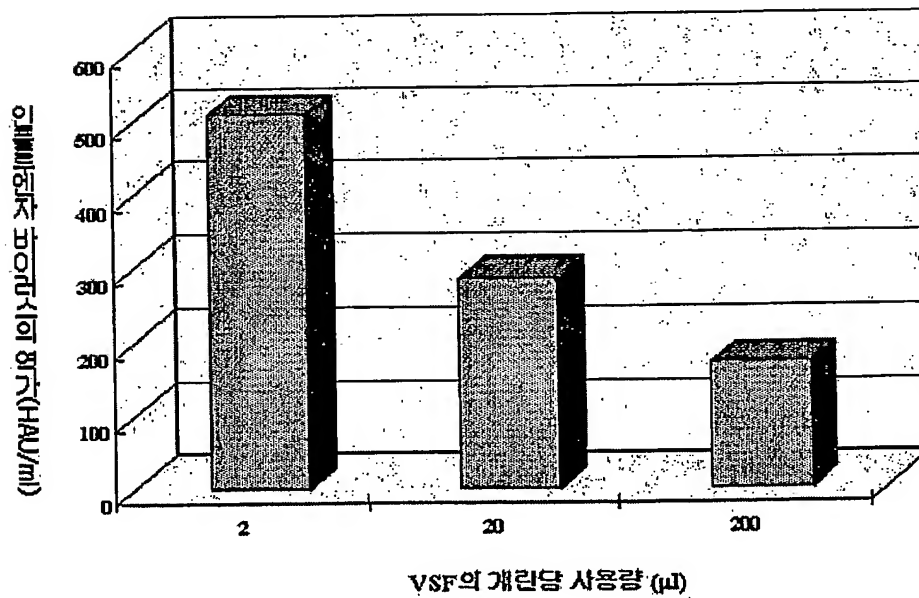
【도 2】



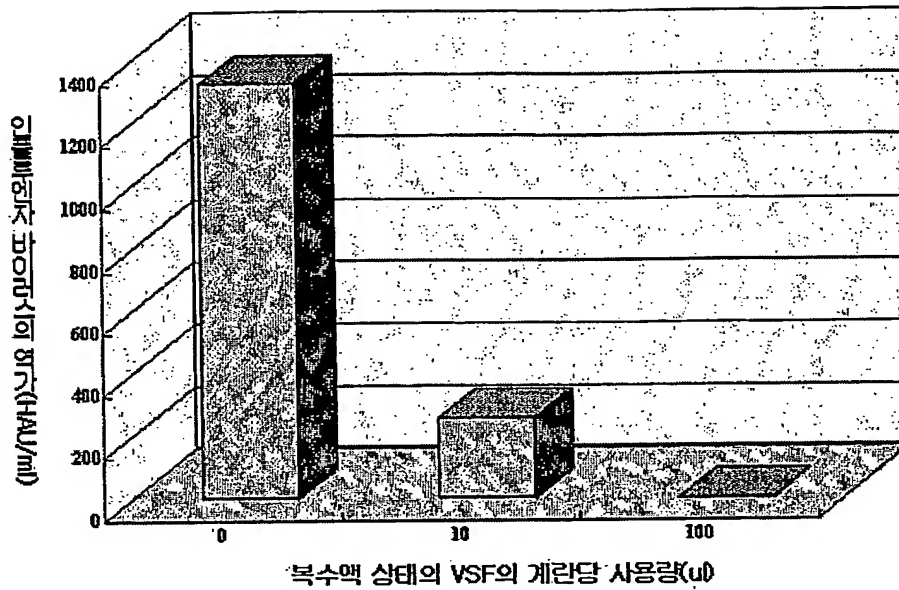
【도 3】



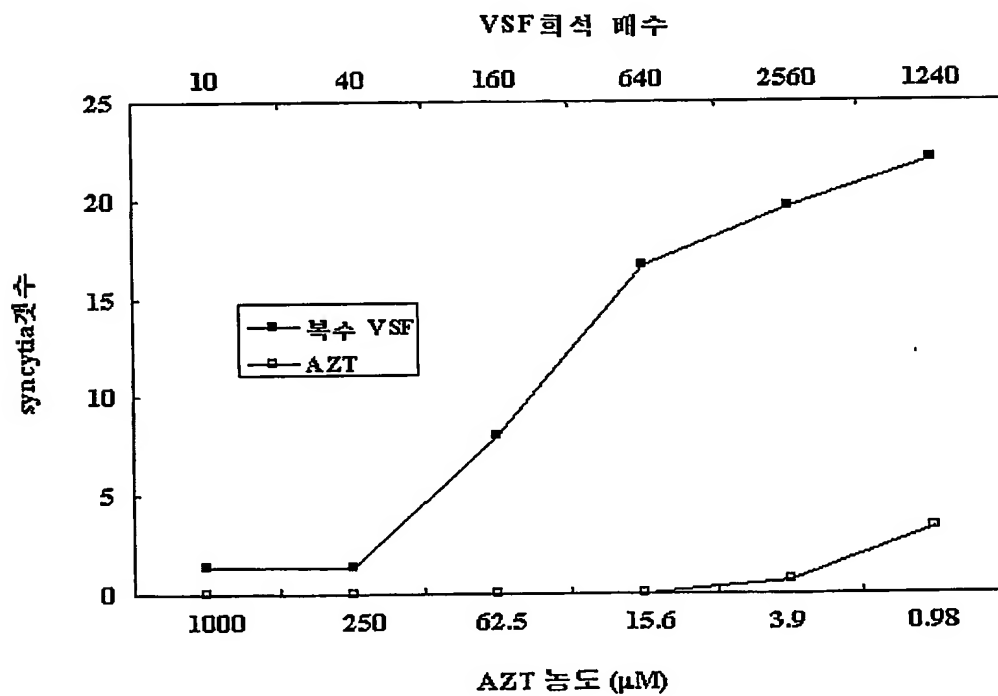
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

